

Institut für Veterinär-Physiologie
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. W. F. Rehm
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

BIOLOGISCHE METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON VITAMIN A
UND DEREN BEURTEILUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

YAIR SCHIFTAN

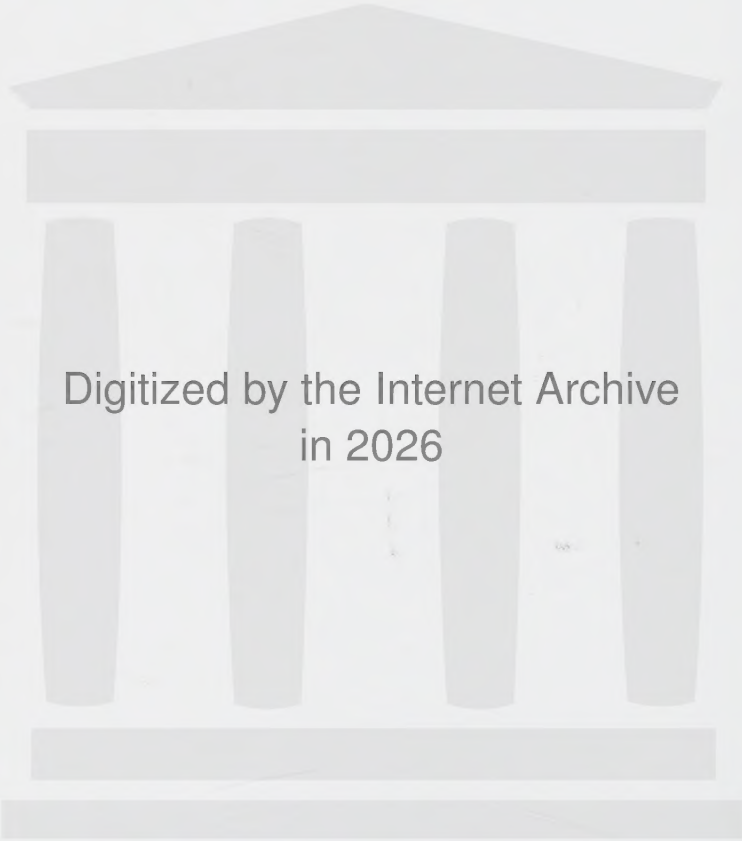
Tierarzt

von Illnau-Effretikon (ZH)

Referenten: Prof. Dr. E. Scharrer
PD Dr. W. F. Rehm
Korreferent: Prof. Dr. H. Jucker

Zürich 1987

Rieker + Partner AG, Glattbrugg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507223_0024

Institut für Veterinär-Physiologie
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. W. F. Rehm
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

BIOLOGISCHE METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON VITAMIN A
UND DEREN BEURTEILUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

YAIR SCHIFTAN

Tierarzt

von Illnau-Effretikon (ZH)

Referenten: Prof. Dr. E. Scharrer

PD Dr. W. F. Rehm

Korreferent: Prof. Dr. H. Jucker

Zürich 1987

Rieker + Partner AG, Glattbrugg

Biologische Vitamin A-Bestimmungsmethoden
und deren Beurteilung

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

1.	Einleitung	1
2.	Allgemeine Auswertungsmethoden zur Beurteilung der vorgelegten experimentellen Daten	3
3.	Kurativer Vitamin A-Leberspeichertest	4
3.1	Literatur	4
3.2	Anordnung und Durchführung der ausgewerteten Untersuchungen	5
3.3	Ergebnisse	8
3.3.1	Prüfung der Zuverlässigkeit der Nominaldosis	8
3.3.2	Verhältnis zwischen Vitamin A-Dosis und Vitamin A-Gehalt der Leber	8
3.3.3	Untersuchung des Einflusses der Zeit auf die Ergebnisse	9
3.4	Schlussfolgerungen	10
3.5	Eigene experimentelle Untersuchungen mit dem kurativen Leberspeichertest	10
3.5.1	Anordnung und Durchführung der Versuche	11
3.5.2	Ergebnisse und Diskussion	12
3.5.2.1	Prüfung der Zuverlässigkeit der Nominaldosis	12
3.5.2.2	Verhältnis zwischen Vitamin A-Dosis und Vitamin A-Gehalt der Leber	12

	Seite:
4. Kurativer Vitamin A-Wachstumstest	14
4.1 Literatur	14
4.2 Anordnung und Durchführung des ausgewerteten Wachstumstests	15
4.2.1 Tiermaterial und Haltung	15
4.2.2 Vitamin A-Dosierung	16
4.2.3 Versuchsverlauf	16
4.2.4 Auswertungsmethode	17
4.3 Ergebnisse	17
4.3.1 Untersuchung des Einflusses der Zeit auf die Ergebnisse	17
4.3.2 Zusammenhang von Dosis und Gewichtszuwachs	18
4.4 Schlussfolgerungen	19
4.5 Eigene experimentelle Untersuchungen mit dem kurativen Wachstumstest	20
4.5.1 Anordnung und Durchführung der Versuche	20
4.5.1.1 Tiermaterial und Haltung	20
4.5.1.2 Vitamin A-Dosierung	20
4.5.1.3 Versuchsverlauf	21
4.5.1.4 Auswertungsmethode	21
4.5.2 Ergebnisse und Diskussion	22

5.	Zusammenfassung der gesamten Studie	23
6.	Literaturverzeichnis	25
	Curriculum vitae	27
	Dankesworte	28
	Tabellen und Graphiken	

1. Einleitung

Zum Nachweis der Vitamine in Futter- und Nahrungsmitteln, in Vitamin-Spezialitäten oder in anderen Zubereitungen bedient man sich im wesentlichen zweier verschiedener Verfahren, und zwar der chemischen Analyse und der biologischen Bestimmung.

Analytische Verfahren dienen dem Nachweis einer spezifischen chemischen Verbindung. Sie werden dort angewendet, wo eine solche Verbindung, deren Wirkung als Vitamin bekannt ist oder die das Vitamin darstellt, bestimmt werden soll.

Wenn der biologische Nachweis einer Vitaminwirkung an einer Zubereitung durchgeführt werden soll, dann ist zu berücksichtigen, dass häufig Wirkstoffgemische mit ähnlicher Struktur eine Vitaminwirkung besitzen. Auch Provitamine besitzen bekannterweise Vitaminwirkung, wenn sie vom Organismus resorbiert werden. Zum Nachweis der Vitaminwirkung hat sich der biologische Versuch deshalb bewährt, weil er über die totale Wirkung eines Vitamins, d.h. des Vitamins per se und dessen Analoge, eine sichere Aussage liefert. Bei Tierversuchen zur Vitaminbestimmung dienen bekannte, vor allem genau definierte Vitamin-Mangelsymptome als Kriterien.

Die Durchführung der Versuche zur Vitaminbestimmung unterlag im Laufe der Zeit gewissen Veränderungen, die vor allem durch die Anpassung an die jeweils als gültig anerkannten Versuchsbedingungen, z.B. Tierspezies, Haltung, Ernährung, Statistik etc., bedingt waren.

Noch Anfang der Sechzigerjahre wurden bei biologischen Versuchen Fehlerbreiten von 30 % beschrieben (Läng, 1962), während heute durch die Standardisierung die Sicherheit der Aussagen erheblich angestiegen ist.

Die biologischen Methoden, die der Ueberprüfung der Wirkungsweise von Vitamin A dienen, berücksichtigen verschiedene Kriterien:

- Der Vitamin A-Gehalt in der Leber dient im kurativen Leberspeichertest als Kriterium für den Vitamin A-Status.
- Die Heilung gewisser pathophysiologischer Erscheinungen, die durch Vitamin A-Mangel hervorgerufen werden können.
Im kurativen Wachstumstest wird z.B. der Einfluss von Vitamin A auf das Wachstum als Kriterium gemessen.
Im Kolpokeratosetest wird als Kriterium für die Vitamin A-Versorgung bzw. die Wirkung von Präparaten die Veränderung des Vaginalepithels gemessen.
- Die Konzentration von Vitamin A im Blut stellt den Parameter der Vitamin A-Aufnahme dar.

Die am meisten benutzten biologischen Versuchsmethoden sind in absteigender Reihe der kurative Leberspeichertest, der kurative Wachstumstest und der Kolpokeratosetest (Embree, 1957).

Die vorliegende Studie befasst sich mit Untersuchungen über den kurativen Vitamin A-Leberspeichertest bei Kühen und über den kurativen Vitamin A-Wachstumstest bei Ratten. Der kurative Leberspeichertest ist ein Test mit einem biologischen und einem physikalisch-chemischen Teil. Der kurative Wachstumstest ist als rein biologisch anzusehen. In allen Tests werden den Versuchstieren nach der Depletierungszeit während mehrerer Tage hintereinander verschiedene Vitamin A-Dosen appliziert. Beim Leberspeichertest beträgt die Vitamin A-Applikation nach der Depletierung 3 Tage, während sie beim Wachstumstest 28 Tage dauert.

In den physiologischen Laboratorien der Zentralen Forschungseinheiten von F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, wurden in den Jahren 1965-1980 zur Prüfung der Vitamin A-Aktivität unter anderem kurative Leberspeichertests und kurative Wachstumstests durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche gesamthaft kritisch auszuwerten, ist Gegenstand der vorliegenden Studie.

Beim Leberspeichertest (1965-1980) wurden formulierte Standardpräparate mit Vitamin A-Acetat und Vitamin A-Palmitat als Vitamin A-aktive Substanzen ausgewählt.

Aus den Wachstumsversuchen (1970-1979) wurden die Standard-Dosierungen mit Vitamin A-Acetat in die Studie aufgenommen.

In eigenen Versuchen sollte beim kurativen Vitamin A-Leberspeichertest geprüft werden, inwieweit im Leberspeichertest die eingesetzten Vitamin A-Dosierungen die Wiederfindungsrate in der Leber beeinflussen, oder ob durch Modifikation der Dosis die Vitamin A-Retention in der Leber verbessert werden könnte.

In weiteren eigenen Versuchen sollte der kurative Vitamin A-Wachstumstest auf seine Eignung zur Prüfung des Vitamin A-Gehaltes einer Probe aus der Vitamin A-Fabrikation im Vergleich zum bekannten Vitamin A-Acetat Standard untersucht werden.

2. Allgemeine Auswertungsmethoden zur Beurteilung der vorgelegten experimentellen Daten

Die Auswertung wurde mit Hilfe des Statistical Analysis System (SAS Users Guide, 1979) mit IBM-Computer durchgeführt. Die Daten wurden zuerst in Form von Urlisten ausgedruckt: Tabellen mit Versuchsnummern, Präparatname, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler, Minimum, Maximum, Tierzahl pro Gruppe und Tierart.

Anschliessend wurden folgende SAS-Programme benutzt:

- Plot-Procedure für Graphiken
- General-Linear-Models Procedure für Regressionen

3. Kurativer Vitamin A-Leberspeichertest

3.1. Literatur

Der kurative Leberspeichertest wurde von Guggenheim und Koch im Jahre 1944 als biologische Methode zur Aktivitätsprüfung von Vitamin A etabliert. Die biologische Methode wurde bevorzugt, da die chemische und physikalische Analyse nicht im Stande war, die Wirksamkeit von Vitamin A zu erfassen. Da die Leber das bevorzugte Organ ist, in dem sich die Vitamin A-Reserve befindet, galt es vorerst, den Zusammenhang zwischen den applizierten Vitamin A-Dosen und deren Leberspeicherung festzustellen. Dazu benutzten Guggenheim und Koch Ratten im Gewicht von 35-40 g als Versuchstiere. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Zuchtweibchen wurden bis zwei Wochen vor dem Absetzen der jungen Ratten mit Gemüse und Milch gefüttert. Danach wurde kein Gemüse mehr zugesetzt. Die Lebern der jungen Ratten enthielten nach dieser Zeit nur noch 3-10 I.E. Vitamin A. Diese Vitamin A-Menge verschwand gänzlich nach 2-6 Tagen, wenn diesen Tieren eine Vitamin A-freie Diät verfüttert wurde.

Vitamin A wurde am ersten und zweiten Versuchstag per os in öliger Lösung appliziert. Am vierten Tag wurden die Tiere entblutet. Die Leber wurde entnommen und der Vitamin A-Gehalt mit der Methode nach Carr und Price (1926) bestimmt. Guggenheim und Koch (1944) versuchten, diesen biologischen Versuch statistisch auszuwerten, indem sie Ratten steigende Vitamin A-Dosen (10, 15, 20, 30 bzw. 35 I.E. Vitamin A pro 10 g KGW) applizierten und den gefundenen Vitamin A-Lebergehalt dazu in Beziehung setzten. Die graphische Darstellung des logarithmierten Vitamin A-Gehaltes der Leber als Funktion der Dosis ergab eine Parabel.

Foy und Morgareidge (1948) haben die Brauchbarkeit des Leberspeichertests bestätigt und nach dem Vergleich mit dem kurativen Wachstumstest folgende Vorteile für den Leberspeichertest beschrieben:

Kurze Depletierungszeit

Sehr kurze Applikationszeit für Vitamin A

Nicht krankheitsanfällige Versuchstiere

Spezifisches Kriterium für die Vitamin A-Aktivität im Vergleich zum Wachstum, das multifaktoriell beeinflussbar ist.

Zwölf Jahre nach der ersten Publikation des Leberspeichertests wurde dieser von Ames und Harris (1956) überarbeitet, und es wurde eine Versuchsanordnung für eine bessere statistische Auswertung vorgeschlagen, die im Prinzip bis heute gilt. Ames und Harris führten zwei Dosierungsstufen des Standards und zwei vergleichbare des Testmaterials mit einer negativen Kontrollgruppe ein. Die relative Aktivität wurde als Verhältnis der Steigung der zwei Geraden ausgedrückt, die zwischen den Ergebnissen der zwei Dosierungsstufen auf Millimeterpapier gezogen wurden. Ames und Harris fanden im Unterschied zu Guggenheim eine lineare Abhängigkeit zwischen Dosis und Lebergehalt im Bereich von 500-10 000 I.E. Vitamin A pro Tier.

3.2 Anordnung und Durchführung der ausgewerteten Untersuchungen

Die Anordnung der in dieser Studie ausgewerteten Untersuchungen basiert auf der von Ames und Harris (1956) eingeführten Methode, mit der Modifikation, dass anstelle von Ratten Küken verwendet wurden. Die Umstellung auf Küken war erfolgt, um für die Geflügelwirtschaft nützliche, praxisnahe Verhältnisse zu schaffen. Im Einzelnen lässt sich die Methode wie folgt beschreiben:

Tiermaterial und Haltung

Es wurden Küken der Rasse Lohmann (Nichols) eingesetzt, die von der Firma Optigal S.A. in Lausanne bezogen wurden. Nach Ankunft im Tierlabor wurden sie nach Geschlecht getrennt. Die Küken wurden in Wärmebatterien in Gemeinschaftshaltung untergebracht, und die anfängliche Temperatur von 32°C wurde bis zum 14. Versuchstag auf 25°C Raumtemperatur reduziert. Die

Beleuchtung erfolgte von 06.00-18.00 Uhr mit gesteuerter Ein- und Ausschaltung von je 30 Minuten Dauer. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 55 %. Trinkwasser und Futter (siehe Tab. 1) wurden ad libitum angeboten. Die Vitamin A-freie Diät war mit den erforderlichen Vitaminen und Mineralien nach den üblichen Angaben für den physiologischen Bedarf angereichert worden.

Vitamin A-Dosierung

Für die Medikation der Versuchstiere wurde das Vitamin A-Pulver in Weizennachmehl so eingemischt, dass 100 mg Weizennachmehl die Vitamin A-Dosis enthielt. Diese 100 mg-Portionen wurden jeweils zu gleichen Anteilen in drei Gelatine kapseln eingefüllt. Drei Gelatine kapseln enthielten also die Dosis pro Tier. Diese betrug 3 000, 4 000, 6 000 bzw. 8 000 I.E. Vitamin A.

Zur Kontrolle des Vitamin A-Gehaltes in der Applikationsdosis wurden pro Gruppe jeweils 10 Portionen für die chemische Kontrollanalyse bereitgestellt.

Versuchsverlauf

Zunächst wurden die Tiere in Gemeinschaftshaltung mit der Vitamin A-freien Diät gefüttert. Zur Ueberprüfung der Vitamin A-Depletierung wurden ab dem 8. Versuchstag einzelne Tiere stichprobenartig entnommen und deren Vitamin A-Gehalt in der Leber untersucht.

Sobald analytisch kein Vitamin A mehr in der Leber nachgewiesen werden konnte, wurden die Tiere den einzelnen Versuchsgruppen zugeteilt. Dabei wurde darauf geachtet, dass in jeder Versuchsgruppe die Anzahl von männlichen und weiblichen Küken gleich war und das mittlere Gewicht der Gruppen nicht stark variierte. Sodann wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen die in Gelatine kapseln abgefüllten Vitamin A-Präparate jedem Küken einzeln verabreicht.

Analytische Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes in der Leber

48 Stunden nach der letzten Vitamin A-Applikation wurden die Tiere getötet, die Lebern eviszeriert, auf Fliesspapier getrocknet und in Braunglasflaschen unter Stickstoff bei -18°C bis zur chemischen Analyse eingefroren.

Bei der Auswahl der Proben zur Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes in der Leber wurde darauf geachtet, dass pro Analysengang gleich viele Proben von jeder Gruppe untersucht wurden.

Die Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes in der Leber wurde mit Hilfe der Anhydromethode nach Budowski und Bondi (1957) ausgeführt.

Auswertungsmethode

Die Versuche wurden so angelegt, dass sie nach dem Vier-Punkt-Parallelverfahren ausgewertet werden konnten (Cavalli-Sforza, 1964). Wenn die biologischen Reaktionen eine lineare Funktion des Logarithmus der Pharmakon-Dosis darstellen, und wenn die Wirkungsgeraden von Standard- und Testpräparat parallel verlaufen, dann sprechen wir von einer Wertbemessung mittels paralleler Geraden. Die Nachprüfung der zuletzt genannten Voraussetzung stellt eine wichtige Phase der gesamten Untersuchung dar. Hierzu müssen sowohl von Standard- wie auch Testpräparat mindestens je zwei Dosen getestet werden. Daher spricht man z.B. von der 4-Punkt-Methode oder von der 6-Punkt-Methode, wenn die Wertbemessung auf je zwei bzw. je drei Dosen aufgebaut ist. Um das Experiment gut zu zentrieren, wählt man vorerst je eine Dosis des Test- und des Standardpräparates, die ungefähr die gleiche Wirksamkeit aufweisen. Daneben werden noch zwei weitere Dosen getestet, die gleich starke Verdünnungen darstellen. Für das hier beschriebene Auswertungsverfahren ist vorausgesetzt, dass die Zahl der Beobachtungen pro Dosis dieselbe ist, und zwar sowohl beim Standard- wie auch beim Testpräparat.

Mit Hilfe der Prüfparameter Zentrierung, Steigung der Regressionsgeraden und deren Parallelität wurde die Qualität jeder Untersuchung beurteilt.

Damit realistische Aktivitätsangaben gemacht werden können, müssen die Geraden eng beieinander liegen, eine grosse Steigung besitzen und parallel verlaufen.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Prüfung der Zuverlässigkeit der Nominaldosis

Voraussetzung für die Brauchbarkeit der Ergebnisse der Vitamin A-Bestimmung in der Leber ist, dass die den Tieren verabreichte Dosis auch tatsächlich der deklarierten Dosis entspricht. Dazu wurde die Weizennachmehlzubereitung der Kapseln analytisch auf ihren Vitamin A-Gehalt untersucht.

Die Ergebnisse sind in der Abb. 1 graphisch und in der Tab. 2 numerisch dargestellt. Aus diesen Darstellungen kann man erkennen, dass die Nominal-Dosis in der Zubereitung wiedergefunden wurde.

Die Streuung der Analysenergebnisse, ausgedrückt in relativer Standardabweichung, liegt innerhalb von 5,59-7,45 %. Diese Befunde bestätigen die gute Übereinstimmung des Analysenwertes mit der deklarierten, nominalen Dosierung.

Es wurden deshalb für die Berechnung des Verhältnisses von applizierter Dosis und Vitamin A-Gehalt in der Leber die Nominalwerte der jeweiligen Dosis verwendet.

3.3.2 Verhältnis zwischen Vitamin A-Dosis und Vitamin A-Gehalt der Leber

Der in den Lebern der mit verschiedener Vitamin A-Dosis behandelten Küken gefundene Vitamin A-Gehalt ist in der Abb. 2 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass etwa die Hälfte des verabfolgten Vitamin A in der Leber wiedergefunden wird. Die Steigerung der Dosis spiegelt sich in dem gefundenen Vitamin A-Gehalt in der Leber entsprechend wider. Die dazugehörigen absoluten Werte findet man in Tab. 3

3.3.3 Untersuchung des Einflusses der Zeit auf die Ergebnisse

Nachdem eine lineare Abhängigkeit der Vitamin A-Leberspeicherung von der Vitamin A-Dosierung festgestellt wurde, ergab sich die Frage, ob die Ergebnisse der Vitamin A-Bestimmungen während der Untersuchungszeit von 1965-1980 konstant geblieben sind, oder ob im Laufe der Zeit eine Veränderung der Ergebnisse zu beobachten war.

Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Jahren vor 1973 war nur auf Grund von Versuchen möglich, die mit Dosierungen von 4 000 und 8 000 I.E. Vitamin A pro Tier erzielt wurden. Für die Dosisgruppen von 3 000 und 6 000 I.E. Vitamin A stammen die Ergebnisse aus den Jahren 1974 und später (Einzelheiten siehe Tab. 4).

Um die absoluten Werte zu veranschaulichen, sind sie in der Abb. 3 graphisch dargestellt. Aus der Aufzeichnung ergibt sich, dass die in der Leber wiedergefundenen Vitamin A-Gehalte von 1965 bis 1973 bzw. 1974 bis 1978 nahezu konstant blieben. Für die Jahre 1979 und 1980 wurde bei den Dosierungen 4 000 und 8 000 I.E. Vitamin A eine Reduktion des wiedergefundenen Vitamin A-Gehaltes in der Leber festgestellt. Nach Diskussion dieses Ergebnisses mit den für die Versuchsanstellung Verantwortlichen wurde festgestellt, dass der Rückgang in der Höhe des Vitamin A-Gehaltes in der Leber durch Veränderungen bei der Herstellung des Vitamin A-Pulvers erklärt werden konnte (H. Weiser, persönliche Mitteilung, 1985).

3.4 Schlussfolgerungen

Mit dem standardisierten Vitamin A-Leberspeichertest nach Ames und Harris (1956) bei Küken wurde während der Versuchsperiode 1965-1980 die Abhängigkeit der Menge des gespeicherten Vitamin A in der Leber von der applizierten Dosis geprüft. Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen für den Vitamin A-Leberspeichertest ziehen:

- Zwischen 46 und 61 % der applizierten Vitamin A-Dosis wurden in der Leber wiedergefunden.
- Zwischen dem Vitamin A-Gehalt in der Leber und der Dosis von 3 000-8 000 I.E. Vitamin A pro Tier besteht eine lineare Beziehung.
- Gewisse Änderungen der Parameter bei der Vitamin A-Herstellung, die 1979-1980 mit dem Ziel einer Stabilitätsverbesserung eingeführt wurden, hatten einen Rückgang des Vitamin A-Gehaltes in der Leber bei den Dosierungen 4 000 und 8 000 I.E.A zur Folge.
- Die Ergebnisse aller Untersuchungen, die während der Versuchsperiode von 1965-1980 durchgeführt wurden, sind miteinander vergleichbar.

Der Vitamin A-Leberspeichertest kann aufgrund der vorliegenden Daten für die Beurteilung von Vitamin A-Präparaten in dem gewählten Dosierungsbereich von 3 000-8 000 I.E. Vitamin A weiterhin vorteilhaft herangezogen werden. Er ist ausreichend sensitiv, um veränderte Verhältnisse bezüglich der Bioverfügbarkeit zu liefern.

3.5 Eigene experimentelle Untersuchungen mit dem kurativen Leberspeichertest

Die eigenen Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit im Leberspeichertest die eingesetzten Vitamin A-Dosierungen die Wiederfindungsrate in der Leber beeinflussen.

3.5.1 Anordnung und Durchführung der Versuche

Der kurative Vitamin A-Leberspeichertest wurde nach der Methode von Ames und Harris (1956) durchgeführt, mit der unter 3.2 beschriebenen Veränderung, dass Küken anstelle von Ratten als Versuchstiere benutzt wurden.

Tiermaterial und Haltung

Es wurden Küken derselben Rasse und Herkunft wie unter 3.2 beschrieben verwendet. Auch die Haltung und Fütterung waren mit den genannten Bedingungen identisch. Die Tiere wurden in 10 Gruppen à 15 Tiere aufgeteilt. Die Zuteilung zu den Gruppen erfolgte zufällig. Einer Gruppe wurden 5 weibliche und 10 männliche Küken zugeteilt.

Vitamin A-Dosierung

Die Zubereitung der Präparate war mit der unter 3.2 angegebenen Vorschrift identisch. Entsprechend der Fragestellung wurden jedoch die Vitamin A-Dosen wie folgt festgelegt:

Gruppe	01	625 I.E. Vitamin A
	02	1 250 I.E. Vitamin A
	03	2 500 I.E. Vitamin A
	04	5 000 I.E. Vitamin A
	05	10 000 I.E. Vitamin A
	06	20 000 I.E. Vitamin A
	07	40 000 I.E. Vitamin A
	08	80 000 I.E. Vitamin A
	09	160 000 I.E. Vitamin A
	10	Weizennachmehl ohne Vitamin A

Von jeder Dosierung wurden zwei Proben für die physikalisch-chemische Inhaltsprüfung abgesondert (s. Tab. 5).

Versuchsverlauf

Das Vitamin A-Präparat wurde, wie bereits beschrieben, in Weizennachmehl eingemischt und in drei Gelatine kapseln gleichmässig verteilt. Jedem Küken wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen pro Tag jeweils eine Gelatine kapsel verabreicht.

48 Stunden nach der letzten Kapselgabe wurden die Küken getötet und die Lebern entnommen.

Analytische Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes in der Leber

Die Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes erfolgte im Extrakt der verseiften Leberproben mittels HPLC unter Verwendung eines fluorometrischen Detektors (Vuilleumier et al., 1983). In vorausgegangenen Parallelbestimmungen konnte gezeigt werden (H.Weiser, persönliche Mitteilung, 1983), dass zwischen der neu eingeführten HPLC-Methode und der Anhydro-Methode nach Budowski und Bondi (1957) zu vernachlässigende Unterschiede in den Analysenergebnissen bestehen.

Auswertungsmethode

Von jeder Gruppe bestehend aus 15 Küken wurden Mittelwert und Standardabweichung des gemessenen Vitamin A-Gehaltes in der Leber berechnet. Dann wurde der relative Vitamin A-Gehalt der Leber bezogen auf die Dosis ermittelt.

3.5.2 Ergebnisse und Diskussion

3.5.2.1 Prüfung der Zuverlässigkeit der Nominaldosis

Die analytische Ueberprüfung des Vitamin A-Gehaltes in den Kapseln ergab eine weitgehende Uebereinstimmung (95,2-104,8 %) mit der angegebenen Nominaldosierung (s. Tab. 5). Diese Ergebnisse entsprechen den unter 3.2 angegebenen Resultaten. Auch in den eigenen experimentellen Versuchen kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Nominaldosierungen tatsächlich den Tieren appliziert wurden.

3.5.2.2 Verhältnis zwischen Vitamin A-Dosis und Vitamin A-Gehalt der Leber

Die Ergebnisse der Vitamin A-Bestimmungen in den Lebern von Küken sind in Tab. 6 enthalten. Es ist ersichtlich, dass nach Applikation von Dosen zwischen 5 000 und 80 000 I.E. Vitamin A zwischen 43 und 40 % der applizierten Dosis in der

Leber wiedergefunden wurde. Bei Dosen zwischen 625 und 2 500 I.E. und der Dosis 160 000 I.E. Vitamin A liegt die Wiederfindungsrate mit 9-31 % eindeutig niedriger als bei den Dosen zwischen 5 000 und 80 000 I.E. Vitamin A. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den in Tab. 4 aufgezeichneten Daten aus den Jahren 1965 bis 1980 ergibt folgendes:

Bei den Dosen von 3 000-8 000 I.E. wurde aufgrund der bis 1978 erzielten Ergebnisse über 50 %, nämlich zwischen 50 und 61 %, der applizierten Dosis Vitamin A in der Leber wiedergefunden. Aus den Jahren 1979 und 1980 sind die Ergebnisse mit der Dosierung 4 000 I.E. niedriger, nämlich 46 und 47 %. Die Resultate der eigenen Untersuchung liegen mit 40-43 % bei den Dosierungen 5 000 bis 80 000 I.E. Vitamin A noch tiefer. Dies dürfte auf eine erhöhte Stabilität des eingesetzten Vitamin A-Pulvers zurückzuführen sein. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann gesagt werden, dass Dosen von < 2 500 und solche von > 160 000 im Vitamin A-Leberspeichertest bei Küken unverhältnismässig niedrige Vitamin A-Gehalte in der Leber ergeben. Ueber die Ursachen dieses Befundes kann nur spekuliert werden. Es könnte sein, dass Dosierungen, die bei < 2 500 I.E. Vitamin A liegen, für Vitamin A-depletierte Küken vom Organismus für den Sofortgebrauch verwendet werden und deshalb die Vitamin A-Menge, die in der Leber gespeichert wird, niedriger ist. Die Dosierung von 160 000 I.E. Vitamin A ergab einen absoluten Wert von 43 249 I.E. Vitamin A in der Leber, prozentual aber nur 27 % der applizierten Dosis. Dieser Wert liegt ausserhalb des linearen Bereiches der Dosis/Wirkungs-Beziehung und dürfte auf eine Ueberforderung der Leberspeicherkapazität zurückzuführen sein (s. Abb. 4).

4. Kurativer Vitamin A-Wachstumstest

Der kurative Wachstumstest zum biologischen Nachweis der Vitamin A-Wirkung nutzt den Einfluss von Vitamin A auf das Wachstum der Tiere, in diesem Fall Ratten, aus. Er misst die Differenz des Wachstums von mit Vitamin A in unterschiedlicher Dosierung versorgten Versuchstieren.

In der vorliegenden Studie wurden diejenigen Versuche ausgewertet, die mit Vitamin A-Acetat als Standard durchgeführt wurden. Am Standardpräparat wurde die Vitamin A-Aktivität in eingewiesenen Lösungen und Lebensmittelproben gemessen.

4.1 Literatur

Die Versuchsanordnung des kurativen Wachstumstests wurde 1948 vom Animal Nutrition Research Council (zitiert nach Embree, 1957) vorgeschlagen:

Vorbehandlung:

Männliche Ratten mit einem Gewicht von 35-50 g mit niedrigen Vitamin A-Reserven erhalten nach dem Absetzen vom Muttertier eine Vitamin A-freie Diät und Wasser ad libitum. Die Tiere werden separat gehalten und mindestens zweimal wöchentlich gewogen, bis das Gewicht stationär bleibt. Eine Ratte wird dann als depletiert angesehen, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- a) Gewichtszuwachs in 4 Tagen 1 g oder weniger.
- b) Mindestens an 2 Tagen keine Gewichtszunahme.
- c) Depletierung in nicht weniger als 18 Tagen und nicht mehr als in 45 Tagen.

Dosierung:

Den Ratten werden Vitamin A-Präparate oral mit einem kalibrierten Injektor verabreicht. Als Standard-Präparat dient all-trans Vitamin A-Acetat, welches in Baumwollsaatöl gelöst wird.

Versuchsverlauf:

Die depletierten männlichen Ratten werden zufällig den einzelnen Versuchsgruppen zugeteilt. Jede Gruppe sollte mindestens 10 Tiere umfassen. Die Versuchsgruppen erhalten eine festgelegte Standard-Dosis bzw. eine vermutlich ähnlich aktive Probe. Die Ratten in der Kontrollgruppe bekommen keine Vitamin A-Zugaben und sollten vor dem Versuchsende sterben.

Für die Medikation werden Montag und Donnerstag als sogenannte Behandlungstage (record days) festgelegt. Im einzelnen wird wie folgt vorgegangen:

An jedem Behandlungstag werden die Tiere gewogen und mit einer halben Wochendosis der Vitamin A-Zubereitung versorgt. Wenn 2/3 der Versuchstiere innerhalb einer Gruppe die Versuchsdauer nicht überleben, wird die Gruppe eliminiert. Das Endgewicht einer Ratte stellt den Mittelwert der Wägungen am 27., 28. und 29. Versuchstag dar.

Die Methode des Animal Nutrition Research Council wurde der US-Pharmakopoe-Kommission 1948 vorgeschlagen und von ihr akzeptiert. Bliss und Roels (1967) brachten später in einigen Punkten Änderungen an, die auch in die Versuchsanordnung für die vorliegende Studie aufgenommen wurden.

4.2 Anordnung und Durchführung der vorgelegten Wachstumstests

Die Anordnung der in der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen basiert auf der von Bliss und Roels (1967) publizierten Methode.

4.2.1 Tiermaterial und Haltung

Um die Versuchstiere rasch depletieren zu können, wurden die Muttertiere mit Vitamin A-reduziertem Futter ernährt. Als Versuchstiere dienten Ratten des Fü-Albino-Stammes. Die Jungratten im Gewicht von 40 ± 2 g wurden nach ihrer Ankunft im Tierlaboratorium während einer Adaptationszeit von 3 Tagen mit

Rattenzuchtfutter ernährt und einzeln in Drahtkäfigen gehalten. In Drahtkäfigen blieben die Tiere während der gesamten Versuchszeit. In der Depletierungsphase wurden eine Vitamin A-freie Diät und Wasser ad libitum angeboten. Diese Diät wurde mit Vitaminen und Mineralien gemäss den Bedarfszahlen angereichert (Zusammensetzung siehe Tab. 7).

4.2.2 Vitamin A-Dosierung

Für die Medikation der Versuchstiere wurde zunächst Vitamin A-Acetat in unterschiedlichen Dosierungen in Arachisöl so gelöst, dass in 0,1 ml die entsprechende Vitamin A-Dosis enthalten war. Das vitaminisierte Arachisöl wurde dann mittels einer Sonde mit einer 1 ml Spritze jeweils morgens in den Oesophagus appliziert. Die Medikation erfolgte täglich im Gegensatz zu der in der U.S. Pharmacopoe beschriebenen Methode, nach der sie nur am Montag und Donnerstag stattfindet. Die Vitamin A-Dosierung pro Tier und Tag erfolgte in den Standardgruppen im Bereich 0,7 bis 4,0 I.E. Vitamin A.

4.2.3 Versuchsverlauf

Die Versuchsratten wurden so lange mit der Vitamin A-freien Diät gefüttert, bis Gewichtskonstanz oder leichte Gewichtsabnahme (bis 2 g) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen erreicht wurde. Um dies festzustellen, wurden die Tiere in den ersten beiden Versuchswochen zweimal wöchentlich und dann täglich gewogen. Tiere, die Gewichtskonstanz erreicht hatten, wurden rein zufällig den Versuchsgruppen zugeteilt. Nach Abschluss dieser Depletierungsphase wurde den Tieren der Versuchsgruppen an den folgenden 28 Tagen Vitamin A, wie unter 4.2.2 erwähnt, appliziert. Die negative Kontrollgruppe erhielt nur das Placebo, aber keine Vitamin A-Zugaben. Die Tiere dieser Gruppe starben während des Versuchsablaufes.

Der Versuchsverlauf lässt sich aus der folgenden Uebersicht ablesen:

a) Depletierungsphase (Vorversuch):

Fütterung mit Vitamin A-freier Diät bis zum Auftreten von Gewichtskonstanz (zwischen 18 und 45 Tagen).

b) Versuchsphase (Hauptversuch):

Einteilung in folgende Gruppen:

- Negative Kontrollgruppe (10-16 Tiere) erhielt keine Vitamin A-Zugabe
- 3 Standardgruppen (12-32 Tiere/Gruppe) erhielten Vitamin A-Acetat
- Testgruppen (12-32 Tiere/Gruppe) erhielten die zu prüfenden Proben, z.B. unbekannte Vitaminlösungen

4.2.4 Auswertungsmethode (siehe auch 2)

Individuell wurden die Differenzen zwischen Anfangsgewicht und Endgewicht der Ratten nach 28 Tagen ermittelt und als Gewichtszuwachs bezeichnet. Gruppenweise wurde das Mittel dieser Werte berechnet. Die Mittelwerte dienten u.a. als Grundlage für die weiteren Berechnungen, nämlich:

- Die Bestimmung der Differenzen der Versuchsergebnisse im Laufe der Zeit von 1970-1979
- Die Darstellung des Zusammenhanges von Gewichtszuwachs und Dosis

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Untersuchung des Einflusses der Zeit auf die Ergebnisse

In der Abb. 5 sind die Gewichtszunahmen jeweils pro Dosis in Abhängigkeit vom Durchführungsjahr der Versuche aufgezeichnet. Die absoluten Werte sind in der Tab. 8 zusammengestellt.

Der Verlauf der Wirkungskurve aus Dosis und Gewichtszunahme stieg in den ersten drei Jahren bei Dosis 1,3 I.E. Vitamin A pro Tier und Tag leicht an und blieb nachher konstant. Die Kurven der Dosen 2,0 und 3,3 I.E. Vitamin A zeigen leicht abfallende Tendenz. Die geringe Anzahl der Versuche und deren

kurze Ausführungszeit in den Jahren 1978-1979 reichen für die Dosis 4,0 I.E. Vitamin A nicht aus, um deren Verlauf zu beurteilen.

Die Dosis 0,7 I.E. Vitamin A wurde nicht dargestellt, da Versuche mit dieser Dosis nur im Jahr 1970 durchgeführt worden sind; auch waren die Zuwachsraten ungenügend (s. 4.3.2). Die mit den übrigen Vitamin A-Dosen erzielten Resultate lassen sich über mehrere Jahre hindurch miteinander vergleichen. Es besteht eine gute Abhängigkeit zwischen Dosierung und Gewichtszunahme während der ganzen Zeit.

4.3.2 Zusammenhang von Dosis und Gewichtszuwachs

Die Zusammenhänge zwischen applizierter Dosis und Gewichtszunahme aus den Jahren 1970-1979 wurden tabellarisch und graphisch dargestellt (Tab. 9 und Abb. 6).

Die Dosis/Wirkungskurve zeigt den üblichen Verlauf mit anfänglich steilem Anstieg und anschliessender Abflachung. Zu den Ergebnissen in den einzelnen Dosierungsgruppen ist folgendes zu bemerken:

Bei der Dosierung von 0,7 I.E. Vitamin A war nicht bei allen 10 Tieren der Gruppe eine Gewichtszunahme zu erreichen, sondern es kam bei drei Tieren zu einer Gewichtsabnahme. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist besonders zu berücksichtigen, dass die Tiere zu Beginn des Hauptversuches durch die Vitamin A-Depletierung schwach sind. Nach Einsetzen der Vitamin A-Behandlung mit zu geringen Dosen muss deshalb mit weiteren Gewichtsabnahmen gerechnet werden. Kranke Tiere mit Gewichtsabnahme werden ebenso wie interkurrent verstorbene Individuen aussortiert und bei der Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Weil bei diesen niedrigen Dosierungen die Zahl der kranken Tiere relativ hoch war (6 von 16), wurde angenommen, dass die "kurative" Vitamin A-Dosis von 0,7 I.E. pro Tier und Tag für eine Redepletierung nicht ausreicht. Diese Dosis-Gruppe wurde deshalb in späteren Versuchen nicht weiter eingesetzt.

Mit den Dosen von 1,3-3,3 I.E. Vitamin A stieg die Dosis/Wirkungskurve linear an, d.h. die depletierten Tiere wurden gesund und nahmen an Gewicht zu.

Im Bereich von 3,3-4,0 I.E. Vitamin A ist offenbar ein Plateau erreicht; es ist anzunehmen, dass es sich um das Phänomen der biologischen Sättigung handelt.

Aus den oben erwähnten Befunden lässt sich folgender Schluss ziehen: Die Untersuchungen im kurativen Vitamin A-Wachstumstest sind vorteilhaft mit den Dosierungen von 1,3-3,3 I.E. Vitamin A durchzuführen, da höhere Vitamin A-Dosierungen zu Ergebnissen führen, die auf dem asymptotischen Teil der Wirkungskurve liegen. Niedrigere Dosierungen führen zu höheren interkurrenten Ausfällen der Versuchstiere und damit zu unsicheren Ergebnissen.

4.4 Schlussfolgerungen

Mit dem standardisierten kurativen Vitamin A-Wachstumstest, modifiziert nach Bliss und Roels (1962), wurde für die Versuchsperiode von 1970-1979 zunächst die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Ausführungsjahr geprüft. Die Ergebnisse sind während dieser Zeit vergleichbar, es besteht während der ganzen Versuchsperiode eine gleichbleibende Beziehung zwischen Dosis und Wirkung.

Der Zusammenhang zwischen Dosis und Gewichtszunahme wurde dann eingehend untersucht. Diese Untersuchung ergab, dass von 1,3 I.E. Vitamin A bis zu einer Dosis von 3,3 I.E. Vitamin A pro Tier und Tag das Gewicht in Abhängigkeit von der Dosis ansteigt. Mit der Dosis von 4,0 I.E. Vitamin A pro Tier und Tag wurde ein weiterer Anstieg des Gewichtszuwachses nicht mehr erreicht. Es kam zu einem Abflachen der Dosis/Wirkungskurve. Die Interpretation des Phänomens ist vermutlich in der biologischen Sättigung zu suchen. Eine Erhöhung der Vitamin A-Menge über den notwendigen Bedarf hinaus bewirkt also keine weitere Gewichtszunahme. Zu niedrige Vitamin A-Dosen wie 0,7 I.E. Vitamin A pro Tier und Tag sind dagegen für den kurativen Wachstumstest nicht geeignet.

4.5 Eigene experimentelle Untersuchung mit dem kurativen Wachstumstest

Während der Durchführung der statistischen Studie zum Vitamin A-Wachstumstest ergab sich die Möglichkeit, diesen Test experimentell zu überprüfen. Dazu wurde eine Probe aus der Vitamin A-Fabrikation auf ihren Vitamin A-Gehalt untersucht.

4.5.1 Anordnung und Durchführung des Versuches

4.5.1.1 Tiermaterial und Haltung

Für die Durchführung der Vitamin A-Bestimmungen wurden männliche Fü-Albino Ratten aus Füllinsdorf bezogen, die mit einem Spezialfutter aufgezogen worden waren, das 3 000 I.E. Vitamin A/kg enthielt.

Damit die Ratten in einer möglichst kurzen Zeit nach Verabreichung der laboreigenen Vitamin A-Mangeldiät Gewichtskonstanz zeigten, wurden sie mit einem Körpergewicht von 30 g abgesetzt und in den Vorversuch genommen.

Während der Depletierungsphase sowie während des Hauptversuches erhielten die Tiere Vitamin A-freies Futter s. Tab. 7.

4.5.1.2 Vitamin A-Dosierung

Das zu verabfolgende Vitamin A wurde zunächst in Form von Stammlösungen wie folgt zubereitet.

Standardpräparat: 12,5 mg Vitamin A-Acetat krist. (enthaltend 36 300 I.E. Vitamin A) wurden in Methylenchlorid gelöst. Dann wurde wenig peroxyd-freies Arachisöl zugegeben, das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft und die Lösung ad 50 g Arachisöl eingestellt.

Testpräparat: 39,4 mg des Testpräparates wurden auf die gleiche Weise in 50 g Arachisöl überführt. Die analytische Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes in der Probe ergab als Mittelwert von mehreren Untersuchungen 0,92 Mio. I.E. Vitamin A/Gramm. Auf diesem Resultat basierte die Berechnung der späteren Medikation des Testpräparates.

Aus den beiden Stammlösungen wurden wöchentlich einmal die zu applizierenden Verdünnungen hergestellt. Diese Verdünnungen enthielten 0,44, 0,70 bzw. 1,12 µg (bzw. 1,3, 2,0, 3,3 I.E. Vitamin A) Vitamin A-Acetat pro 0,1 ml Arachisöl. Das mit verschiedenen Vitamin A-Mengen angereicherte Arachisöl wurde mittels einer Sonde täglich in den Oesophagus verabreicht.

4.5.1.3 Versuchsverlauf

Sobald ein Tier in der Depletierungsphase (s. 4.2.4) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen keine Gewichtszunahme mehr zeigte, wurde es in die eigentliche Versuchsphase (Hauptversuch) genommen. Während 28 Tagen wurden die Tiere täglich mit einer bestimmten Standard- bzw. Testdosis oral behandelt. Zur Eliminierung von Umwelteinflüssen wurden die Tiere in den einzelnen Gruppen vertikal aufgestellt. Die Gewichtszunahmen der Tiere dienten als Parameter.

4.5.1.4 Auswertungsmethode

Für die statistische Auswertung wurde das 6-Punkt-Parallelverfahren mit den erforderlichen Prüfparametern Standard im Vergleich zur Probe, kombinierte Steigung, Parallelität der Regressionsgeraden verwendet (Cavalli-Sforza, 1964). In Abhängigkeit von der erwarteten Wirksamkeit wurden die Dosierungen für Standard und Probe so gewählt, dass die Wirksamkeitsgeraden praktisch deckungsgleich und parallel verlaufen und die Wirkungen auf den steilen Ast der Dosiswirkungskurve zu liegen kommen.

4.5.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse des kurativen Wachstumstests sind in der Tab. 10 angegeben. Die Mittelwerte dieser Tabelle sind in Abb. 7 graphisch aufgezeichnet. In Tab. 11 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der beiden Präparate enthalten. Danach besitzt die Testprobe im Vergleich zum Vitamin A-Standard eine relative Aktivität von 108,3 % (in den Grenzen 101,2-116,1 %), was einem Gehalt von $1,083 \cdot 0,92 \text{ Mio} = 0,996 \text{ Mio I.E. Vitamin A pro Gramm}$ für das Testpräparat entspricht.

Aus der Tab. 11 ist weiterhin ersichtlich, dass die Nullhypothese für die gemeinsame Steigung der Regressionsgeraden zu verwerfen ist. Das besagt, dass die erforderliche Steigung der Geraden für Parallelvergleiche erreicht wurde.

Bei Prüfung auf Parallelität wurde die Nullhypothese nicht bestätigt, d.h. die Geraden verlaufen nicht parallel [t-Wert 2,06 im Vergleich zum t-Tafelwert (für P 0,05) von 1,98 bei 87 Freiheitsgraden]. Aus der graphischen Darstellung (Abb. 7) ist jedoch zu entnehmen, dass die beiden Geraden für einen Wirksamkeitsvergleich noch verwendet werden können.

Der mittlere Fehler des Mittelwertes kann mit 3,5 % für den Parameter Wachstum als sehr klein angesehen werden (wünschenswert < 5 %).

Mit dem Empfindlichkeitsmass (λ), dem Quotienten aus Standardabweichung und Steigung der Regressionsgeraden, lässt sich die Qualität eines Versuches sofort beurteilen. Im vorliegenden Fall ist λ (0,07) deutlich kleiner als der noch zulässige Wert von 0,3, d.h. der Test zur Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes oder der Wirksamkeit der Probe ist vollumfänglich aussagekräftig.

5. Zusammenfassung der gesamten Studie

In der vorliegenden Studie wurden die Ergebnisse von zwei biologischen Tests zur Prüfung auf Vitamin A-Aktivität, die im Verlaufe von mehreren Jahren durchgeführt worden sind, statistisch ausgewertet. Ausserdem wurden für zwei eigene experimentelle Untersuchungen die genannten Tests eingesetzt.

Mit dem kurativen Vitamin A-Leberspeichertest (Periode 1965-1980) wurden Versuche mit insgesamt 2 208 Küken, aufgeteilt in 160 Gruppen, ausgewertet. Nach dieser Auswertung sind die Ergebnisse über Jahre hinweg vergleichbar. Im Bereich von 3 000-8 000 I.E. Vitamin A besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der Dosierung und dem Vitamin A-Gehalt in der Leber.

In eigenen Untersuchungen zum Vitamin A-Leberspeichertest wurde die Frage geprüft, ob die bisher in diesem Test eingesetzten Vitamin A-Dosierungen eine maximale Wiederfindungsrate in der Leber ergeben, oder ob durch andere, z.B. niedrigere oder höhere, Dosierungen das Verhältnis applizierte Vitamin A-Dosis/ Vitamin A-Gehalt in der Leber verbessert werden könnte. Hierzu wurden 10 Gruppen mit je 15 Küken eingesetzt. Die Dosierungen lagen im Bereich von 625-160 000 I.E. Vitamin A (625, 1 250, 2 500, 5 000, 10 000, 20 000, 40 000, 80 000, 160 000 I.E. Vitamin A) pro Tier .

In diesen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass im kurativen Vitamin A-Leberspeichertest bei Küken höhere Vitamin A-Leberretentionen von 43 und 41 % im Dosierungsbereich von 5 000-80 000 I.E. Vitamin A zu erzielen sind als in den anderen untersuchten Dosierungen. Die Dosierungen von 625, 1 250 und 2 500 ergaben unverhältnismässig niedrigere Vitamin A-Leberretentionen. Auch bei der höchsten Dosierung von 160'000 I.E.A wurde eine stark reduzierte Retention gefunden, vermutlich infolge der Ueberforderung der Speicherkapazität der Leber.

Beim kurativen Vitamin A-Wachstumstest (Periode 1970-1979) wurden Versuche mit insgesamt 1 538 Ratten, aufgeteilt in 82 Grup-

pen, durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche sind über Jahre hinweg miteinander vergleichbar. Dosierungen des Standardpräparates im Bereich von 0,7-4,0 I.E. Vitamin A pro Tier und Tag wurden ausgewertet und folgende Schlüsse gezogen: Im Dosierungsbereich von 1,3-3,3 I.E. Vitamin A pro Tier und Tag besteht eine weitgehend lineare Beziehung zwischen der Dosis und der Gewichtszunahme. Die Dosis von 0,7 I.E. Vitamin A pro Tier und Tag erwies sich als zu niedrig für den kurativen Wachstumstest. Mit der Dosis von 4,0 I.E. Vitamin A wurden Sättigungswerte erreicht, so dass auch diese für die Testung von Dosis/Wirkungsbeziehungen nicht geeignet ist.

Die eigenen Untersuchungen mit dem kurativen Vitamin A-Wachstumstest zur Bestimmung der relativen Wirksamkeit einer Vitamin A-Probe wurden mit 6 Gruppen zu je 16 Ratten durchgeführt. Mit den gewählten Dosierungen von 1,3, 2,0 und 3,3 I.E. Vitamin A pro Tier und Tag wurde eine gute Dosis/Wirkungsbeziehung für das Standard- und Testpräparat erreicht, so dass ein Vergleich der Präparate bezüglich deren Vitamin A-Wirksamkeit möglich war.

6. Literaturverzeichnis

Ames, S.R., Harris, P.L.: Slope-Ratio Liver-Storage Bioassay for Vitamin A. Anal. Chem. 28, 874-878 (1956)

Bliss, C.I., Roels O.A. : Bioassay of Vitamin A Potency, in THE VITAMINS, sec. ed., Vol. VI, Ed. György, P. and Pearson, W.N., pp. 197-210 (1967)

Budowski, P., Bondi, A.: Determination of Vitamin A by Conversion of Anhydro-Vitamin A. Analyst 82, 751-760 (1957)

Carr, F.H., Price, E.A.: Colour Reactions Attributed to Vitamin A. Biochem. J. 20, 497-501 (1926)

Cavalli-Sforza, L.: Grundbegriffe der Biometrie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1964)

Embree, N.: Determination of Vitamin A. Methods of Biochemical Analysis 4, 43-98 (1957)

Foy, J.R., Morgareidge, K.: Biological Assay of Vitamin A. Anal. Chem. 20, 304-307 (1948)

Guggenheim, K., Koch, W.: A Liver Storage Test for the Assessment of Vitamin A. Biochem. J. 38, 256-260 (1944)

Jürgens, R.: Zur Wirkung von synthetischem Vitamin A Arzneimittelforsch. 1, 119-128 (1951)

Kahan, J.: A Method for the Fluorometric Determination of Vitamin A. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18, 679-690 (1966)

Lang, K.: Die Physiologie der Vitamine. Handbuch der allgemeinen Pathologie. Springer Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg (1962)

SAS User's Guide: SAS Institute Inc. Raleigh, North Carolina, edition 1979

Vuilleumier, J.-P., Keller, H.E., Gysel, D., Hunziker, F.:
Clinical Chemical Methods for the Routine Assessment of the
Vitamin Status in Human Populations. Internat.J.Vit.Nutr.Res.
53, 265-272 (1983)

Weiser, H.: Biologische Qualitätskontrolle vitaminhaltiger
Produkte mit optimierten Modellen. Roche, Animal Nutrition
Events. Internationales Symposium "Das Tier im Experiment",
Zürich, 1976

Curriculum Vitae

- 11.3.1952 in Zabrze, Polen, geboren
- 1959 Besuch der ersten vier Primarklassen in Polen
- 1964 Auswanderung nach Israel
- 1967 Abschluss der Primarschule in Neveh Hadassa
- 1971 Gymnasialabschluss, Matura humanistischer Richtung, in Jerusalem
- 1975 Eheschliessung mit Maja Brandenburger
- 1975-1977 Veterinärmedizinisches Studium an der Université de Liège, Belgien
- 1977-1981 Veterinärmedizinisches Studium an der Universität Zürich mit Diplomabschluss
- 1981 Geburt der Tochter Dania Janine
- 1981-1982 Assistententätigkeit am Institut für Zuchthygiene der Universität Zürich
- Ab 1982 Assistent in privaten Kleintierkliniken im Kanton Zürich. Diverse Stellvertretungen als Fleischbeschauer in den Schlachthöfen Hinwil, Zürich, und Langnau i.E., Bern, sowie Stellvertretungen als Grosstierpraktiker in Interlaken (BE) und Ossingen (ZH).
- 1983 Geburt des Sohnes Raphael Olivier

Dankesworte:

Die vorliegende Arbeit entstand in den Laboratorien der Zentralen Forschungseinheiten der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. in Basel. Herrn Dr. H. Weiser möchte ich für den Zugang zu seinen Forschungsergebnissen und seiner Dokumentation, sowie für seine Beratung bei der Planung und Durchführung meiner eigenen Versuche danken. Herrn PD Dr. W.F. Rehm (Referent) bin ich für die Koordination und wissenschaftliche Leitung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt auch den Herren Dr. E. Röttig, Dr. H. Rickenbach und Dr. B. Schiffer für ihre Beratung im mathematischen Bereich sowie für Hilfe bei der EDV-Auswertung.

Besonderer Dank gilt den Herren Professoren Dr. E. Scharrer (Referent) und Dr. H. Jucker (Korreferent) für ihr Interesse und die wertvollen Beiträge bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Tabelle 1: Vitamin A-Leberspeichertest

Zusammensetzung der Vitamin A-freien Diät für Küken

1a) Grunddiät

Gebrochener Reis	26,0 %
Maisstärke	18,0 %
Casein, durch Extraktion vitaminfrei	15,0 %
Zucker, krist.	10,8 %
Mineralstoffvormischung, siehe unten	6,0 %
Isoliertes Sojaprotein (Soyamin 90)	5,0 %
Sojabohnenmehl, durch Extraktion vitaminfrei	5,0 %
Fischmehl, fettarm	5,0 %
Sojaöl	4,0 %
Zellulose (SANACEL-Granulat 300)	2,0 %
Vitaminvormischung (Vitamin A-frei), siehe unten	2,0 %
Traubenzucker	1,0 %
Phosphorylcholin	0,2 %

1b) Zusammensetzung der Mineral-
stoff- und Spurenelement-
vormischung pro kg Diät

CaCO ₃	15,00 g
Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	14,00 g
K ₂ HPO ₄	10,00 g
NaCl	8,00 g
Na ₂ HPO ₄	7,00 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	5,00 g
Fe(C ₆ H ₅ O ₇) 6H ₂ O	0,45 g
ZnO	0,06 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,02 g
KJ	0,04 g
MnSO ₄ H ₂ O	0,17 g
	59,74 g

1c) Zusammensetzung der Vitamin A-
freien Wirkstoffvormischung
pro kg Diät

Vitamin D ₃	1 000 I.E.
Vitamin E	30 I.E.
Menadionnatrium-	
bisulfit (K ₃)	2 mg
Biotin	0,3 mg
Folacin	4 mg
Kalzium-D-panto-	
thenat	20 mg
Niacin	100 mg
Riboflavin	15 mg
Thiamin HCl	25 mg
Vitamin B ₆	8 mg
Vitamin B ₁₂	30 µg
Vitamin C	25 mg
DL-Methionin	2 g
L-Phenylalanin	3 g
Chlortetracyclin	50 mg
Weizennachmehl ad	20 g

Tabelle 2: Vitamin A-Leberspeichertest

Überprüfung der nominalen Dosen auf ihren Gehalt
durch chemische Analyse

Nominale Dosis (I.E. Vitamin A/100 g Weizennachmehl)	Analytisch ermittelter Gehalt der Proben (I.E. Vitamin A, $\bar{x} \pm SD$)
3 000	2 964 $\pm$ 221
4 000	3 947 $\pm$ 233
6 000	5 887 $\pm$ 369
8 000	8 099 $\pm$ 453

Tabelle 3: Vitamin A-Leberspeichertest (Küken)
Vitamin A-Gehalt pro Leber nach verschiedenen Vitamin
A-Dosierungen (Dosen und Gehalt in I.E. Vitamin A)

Dosis	Anzahl Tiere (n)	Vitamin A-Gehalt der Leber ($\bar{x} \pm SD$)
3 000	830	1 544 $\pm$ 273
4 000	274	2 009 $\pm$ 390
6 000	830	3 510 $\pm$ 547
8 000	274	4 514 $\pm$ 672

Tabelle 4: Vitamin A-Leberspeichertest: Dosis und jahrgangsweise
Zusammenstellung der Ergebnisse

Dosis (I.E.Vit.A/ Tier)	Ausfüh- rungs- jahr	Anzahl Gruppen	Tiere Total	Vitamin A-Gehalt der Leber (I.E.Vit.A, $\bar{x}$ + SD)	Vitamin Retenti (% Dosi
3 000	1974	22	305	1585 + 213	53
3 000	1975	15	210	1507 + 148	50
3 000	1978	21	315	1530 + 167	51
4 000	1965	2	20	2238 + 14	56
4 000	1966	1	5	2102	53
4 000	1973	6	74	2265 + 142	57
4 000	1978	1	15	2180	55
4 000	1979	9	115	1878 + 230	47
4 000	1980	3	45	1857 + 157	46
6 000	1974	22	305	3401 + 395	57
6 000	1975	15	210	3597 + 374	60
6 000	1978	21	315	3558 + 290	59
8 000	1965	2	20	4851 + 40	60
8 000	1966	1	5	4710	59
8 000	1973	6	74	4899 + 262	61
8 000	1978	1	15	4677	58
8 000	1979	9	115	4284 + 382	54
8 000	1980	3	45	4385 + 101	55

Tabelle 5: Vitamin A-Leberspeichertest: Ueberprüfung der nominalen Dosen auf ihren Gehalt durch chemische Analyse

Gruppe	Nominale Dosis (I.E.Vit.A/Probe)	Analytisch gefundener Gehalt (I.E.Vit.A/Probe) Mittelwert aus Doppelbestimmung	
		Absoluter Wert	Prozent der Nominaldosis
1	625	655	104,8
2	1 250	1 232	98,6
3	2 500	2 316	99,6
4	5 000	4 890	97,8
5	10 000	9 610	96,1
6	20 000	19 420	97,1
7	40 000	38 490	96,2
8	80 000	77 280	96,6
9	160 000	152 320	95,2
Kontrolle	0	0	

Legende: Die Vitamin A-Menge (Dosis) wurde jeweils in 100 mg Weizenmehl als Träger verabfolgt

Tabelle 6: Vitamin A-Leberspeichertest

Vitamin A-Gehalt pro Leber nach verschiedenen Vitamin A-
Dosierungen (Anzahl Küken/Gruppe = 15, Dosen und Gehalt
in I.E. Vitamin A)

Gruppe (n=15)	Dosis pro Tier	Lebergewicht in Gramm ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Vitamin A-Gehalt pro Leber ($\bar{x} \pm \text{SD}$)		Vitamin A- Retention (% Dosis)
1	625	23 $\pm$ 0,8	57 $\pm$	4	9
2	1 250	24 $\pm$ 0,9	206 $\pm$	10	17
3	2 500	24 $\pm$ 0,7	783 $\pm$	44	31
4	5 000	23 $\pm$ 1,0	2 157 $\pm$	48	43
5	10 000	23 $\pm$ 1,0	4 342 $\pm$	96	43
6	20 000	24 $\pm$ 0,7	8 465 $\pm$	176	42
7	40 000	23 $\pm$ 0,1	16 577 $\pm$	468	41
8	80 000	25 $\pm$ 0,7	31 714 $\pm$	1 033	40
9	160 000	23 $\pm$ 0,6	43 249 $\pm$	1 695	27
10	0	19 $\pm$ 1,0	7 $\pm$	4	

Tabelle 7: Vitamin A-WachstumstestZusammensetzung der Vitamin A-freien Diät für Ratten
(nach Jürgens 1951)7a) Grunddiät

Ingredienzen	Anteile %
Reisstärke, durch Extraktion vitaminfrei	54
Casein, durch Extraktion vitaminfrei	18
Cocosfett	13
Trockenhefe	10
Mineralstoff- und Spurenelementvormischung	5

7b) Zusammensetzung der Mineralstoff- und Spurenelement-
Vormischung pro kg Diät

Salze	Einwaage g	Salze	Einwaage g
K_2HPO_4	13,25	Fe(II) Gluconat $\cdot 2H_2O$	1,600
$CaCO_3$	10,00	KJ	0,045
$Ca(C_3H_5O_3)_2 \cdot 5H_2O$	7,50	$ZnCO_3$	0,015
$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	7,50	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,015
Na_2HPO_4	4,79	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,010
$MgSO_4 \cdot 3H_2O$	2,75	NaF	0,0015
NaCl	2,50		

- 7c) Zusammensetzung der Vitamin A-freien Wirkstoff-Vormischung,
die über das Trinkwasser verabreicht wurde*

Wirkstoffe	Aufnahme pro kg Futter
Vitamin D ₂	1 000 I.E.
Vitamin E	50 I.E.
Kalzium-D-pantothenat	50 mg
Niacin	100 mg
Riboflavin-5'-phosphat	40 mg
Thiaminchlorid·HCl	10 mg
Vitamin B ₆	20 mg
Phosphorylcholin	1 000 mg

* Ratten nehmen etwa doppelt soviel
Trinkwasser auf wie Trockenfutter

Tabelle 8: Vitamin A-Wachstumstest: Dosis und jahrgangsweise
Zusammenstellung der Ergebnisse

Dosis (I.E.Vit.A/ Tag/Tier)	Jahr	Anzahl Gruppen	Tiere Total	Gewichtszunahme, g ($\bar{x}$ $\pm$ SD)
1,3	1970	5	80	37 $\pm$ 8
1,3	1971	7	159	45 $\pm$ 13
1,3	1972	4	82	48 $\pm$ 17
1,3	1973	3	66	50 $\pm$ 15
1,3	1976	1	16	49
2,1	1970	4	64	73 $\pm$ 9
2,1	1971	7	159	77 $\pm$ 8
2,1	1972	4	82	76 $\pm$ 9
2,1	1973	3	66	65 $\pm$ 21
2,1	1974	2	28	75 $\pm$ 19
2,1	1975	6	91	69 $\pm$ 12
2,1	1976	2	32	63 $\pm$ 1
2,1	1978	4	64	61 $\pm$ 12
2,1	1979	1	16	55
3,3	1970	4	64	98 $\pm$ 13
3,3	1971	6	134	94 $\pm$ 6
3,3	1972	4	82	92 $\pm$ 4
3,3	1973	3	66	90 $\pm$ 4
3,3	1974	1	16	97
3,3	1975	4	59	76 $\pm$ 13
3,3	1976	2	32	79 $\pm$ 3
4,0	1978	4	64	79 $\pm$ 17
4,0	1979	1	16	81

Tabelle 9: Vitamin A-Wachstumstest bei Ratten: Gewichtszunahme nach
verschiedenen Vitamin A-Dosierungen

Dosis (I.E.Vit.A/ Tag/Tier)	Anzahl Tiere	Gewichtszunahme, g ($\bar{x} \pm SD$)
0,7	10	4 $\pm$ 19
1,3	403	45 $\pm$ 22
2,0	602	72 $\pm$ 21
3,3	453	90 $\pm$ 22
4,0	80	79 $\pm$ 22

Tabelle 10: Vitamin A-Wachstumstest bei Ratten: Bestimmung der relativen Wirksamkeit des Testpräparates im Vergleich zum Standardpräparat bei täglicher Dosierung
Parameter: Gewichtszunahme in Gramm während der 28-tägigen Versuchsperiode

Prüfsubstanz	Vitamin A-Acetat (Standard)						Testpräparat	
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6		
Dosierung $\mu\text{g}/\text{Tag}/\text{Tier}$	0,44	0,70	1,12	0,44	0,70	1,12		
Gewichtszunahme, g ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	39 ± 8	84 ± 14	115 ± 16	47 ± 8	86 ± 13	116 ± 9		

Legende: Pro Gruppe wurden 16 Tiere eingesetzt

- *) 0,44 μg = 1,3 I.E. Vitamin A
 0,70 μg = 2,0 I.E. Vitamin A
 1,12 μg = 3,3 I.E. Vitamin A

Tabelle 11: Vitamin A-Wachstumstest: Daten der statistischen Auswertung des kurativen Wachstumstest zur Bestimmung der relativen Wirksamkeit des Vitamin A-Testpräparates

Wertbemessung mittels 6-Punkt-Parallel-Verfahren (nach Bliss 1967, S. 506)

<u>Relative Wirksamkeit:</u>	Logarithmus	Antilog.100
Mittelwert ($\bar{x}$)	0,0341	<u>108,2 %</u>
Standardfehler (SE)	0,0148	
<u>Vertrauensbereich:</u>		
Obere Vertrauensgrenze (XL_1)	0,0647	<u>116,1 %</u>
Untere Vertrauensgrenze (XL_2)	0,0057	<u>101,2 %</u>
<u>Empfindlichkeitskontrolle:</u>		
$\lambda = SD/b$	0,0723	
SD = Standardabweichung		
b = Steigung der Regressionsgeraden		
<u>Gültigkeitskontrolle:</u>	t-Werte	
Regression	22,59	
Parallelität	2,06	
$t_{0,05} (87 \text{ FG})$	1,98	

Relative Wirksamkeit: Aktivität des Testpräparates im Vergleich zum Standard

Vertrauensbereich: Berechnet nach der Formel $XL_{1,2} = C^2 \cdot \bar{x} \pm C \cdot SE \cdot t$ (für P 0,05); C = Erweiterungsfaktor

Statistische Prüfparameter zur Beurteilung der Qualität des Versuches

Empfindlichkeitsmass: Quotient aus Standardabweichung und gemeinsamer Steigung der Regressionsgeraden; je kleiner die Standardabweichung und je grösser die Steigung, desto besser die Aussage.

Regression: Bei guter Dosis-Wirkungsbeziehung wird die Nullhypothese nicht bestätigt.

Parallelität: Bei parallelem Verlauf der Regressionsgeraden wird die Nullhypothese bestätigt.

Analytisch bestimmter Vitamin A-Gehalt der Zubereitung in I.E. Vit. A

Abb. 1:
Vitamin A-Leberspeichertest (Küken)
Prüfung der Nominaldosis

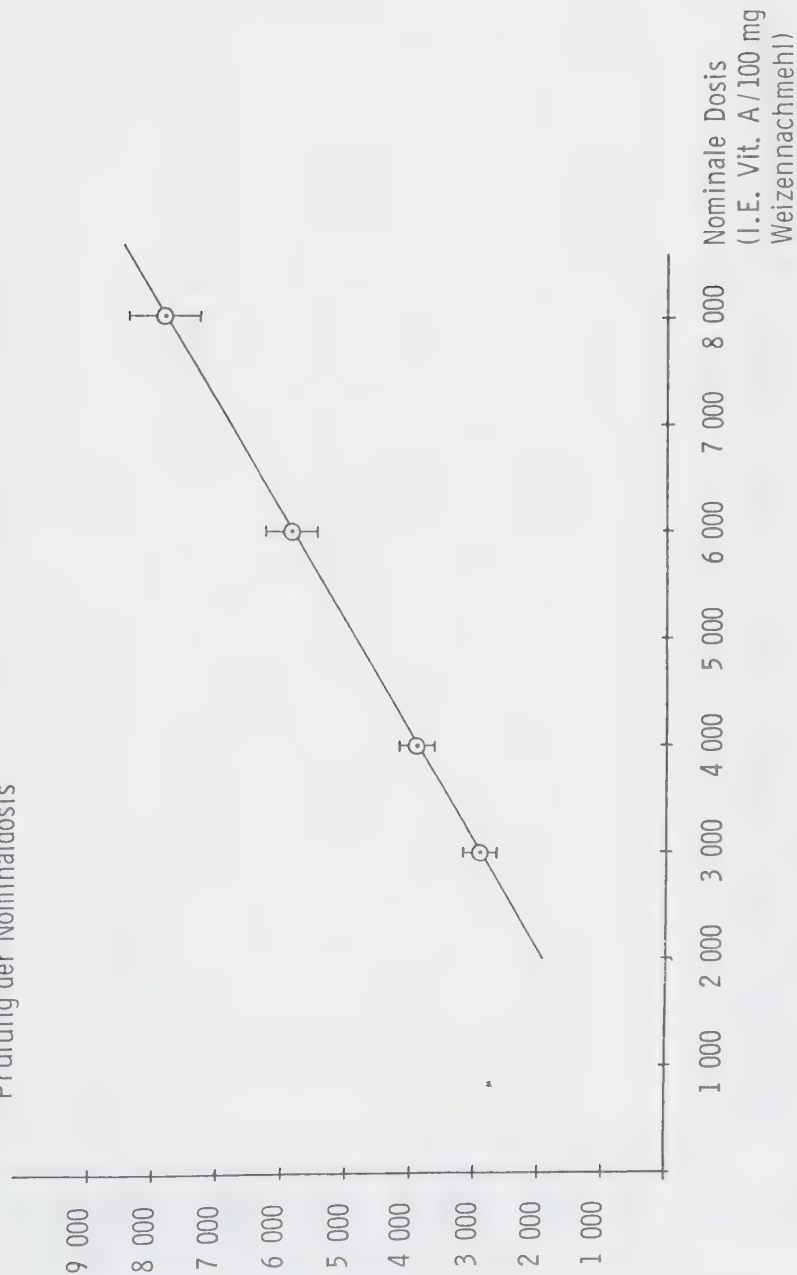


Abb. 2: Vitamin A-Leberspeichertest (Küken)

Vitamin A-Gehalt in der Leber nach Verabreichung verschiedener Vitamin A-Dosierungen

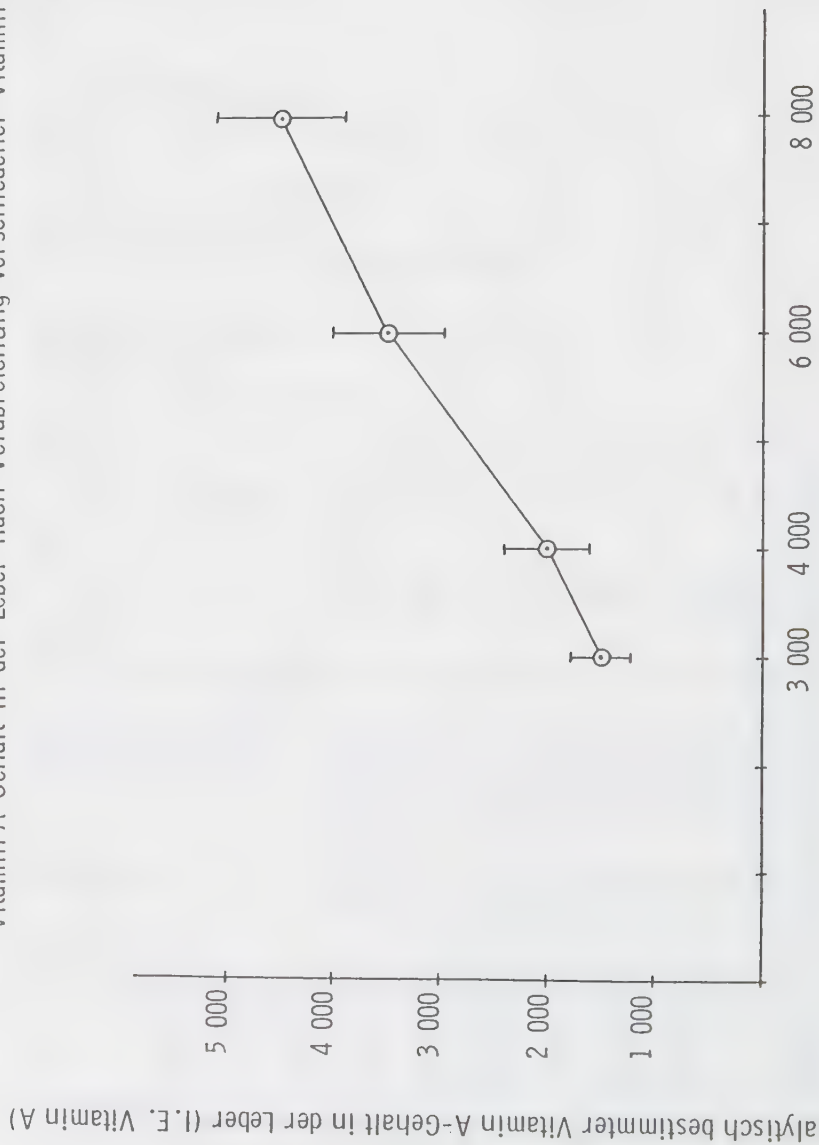


Abb. 3: Vitamin A-Leberspeichertest (Kühen)

Vitamin A-Bestimmungen in der Leber im Verlauf mehrerer Jahre (1965-1980)

(Dosis in I.E. Vit. A/Tier)

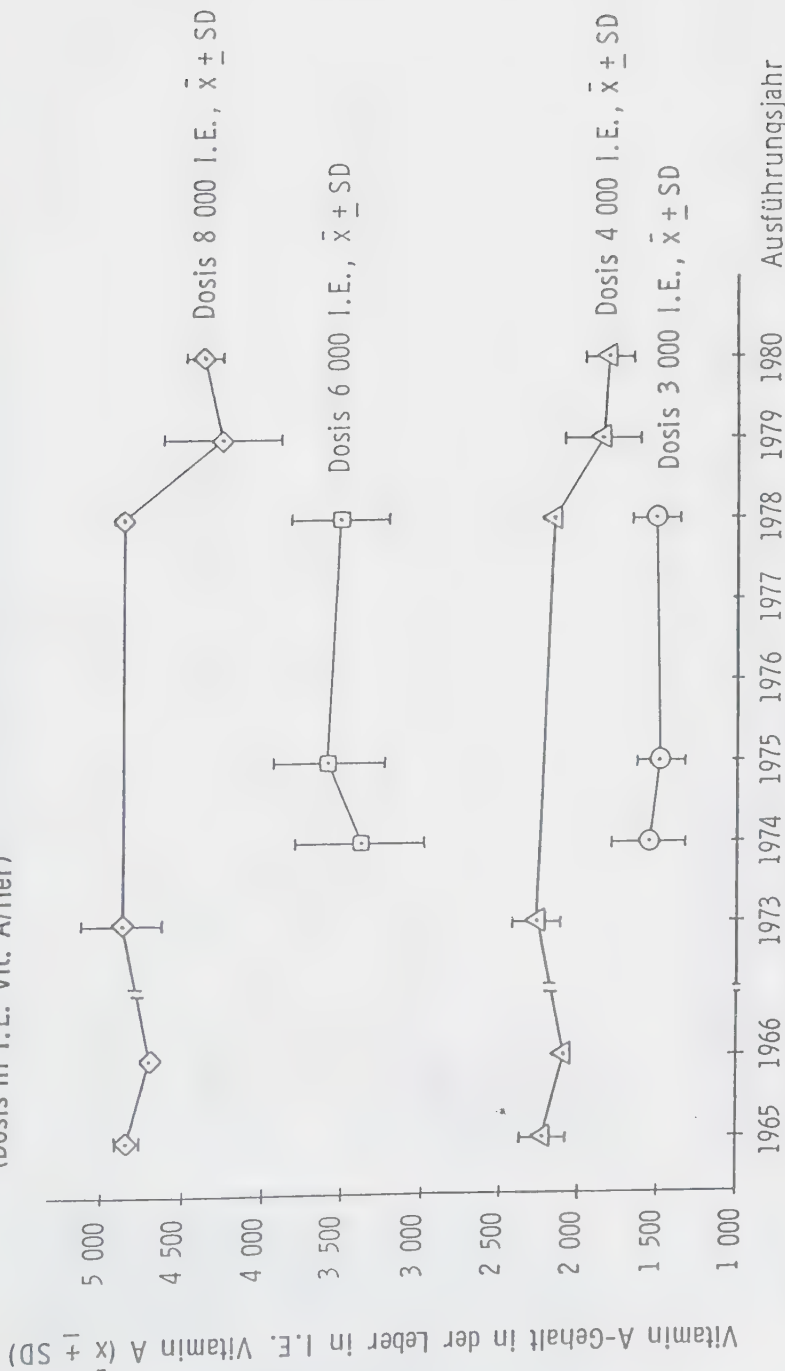


Abb. 4 :

Vitamin A-Leberspeichertest (Kühen)

Logarithmische Darstellung der Abhängigkeit des Lebergehaltes von der applizierten Vitamin A-Dosis

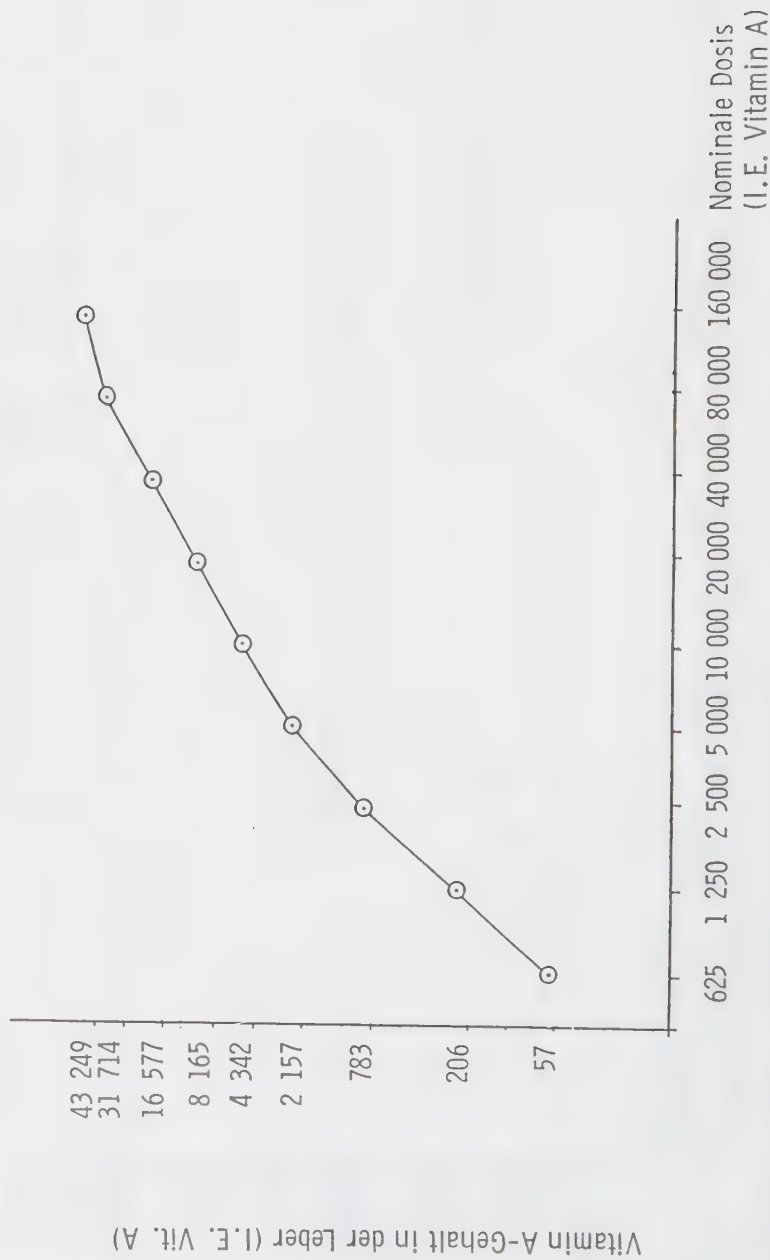


Abb. 5 :

Vitamin A-Wachstumstest (Ratten)

Darstellung der Gewichtszunahme in Abhängigkeit von den Ausführungsjahren der Versuche (Dosis in I.E. Vitamin A/Tag/Tier)

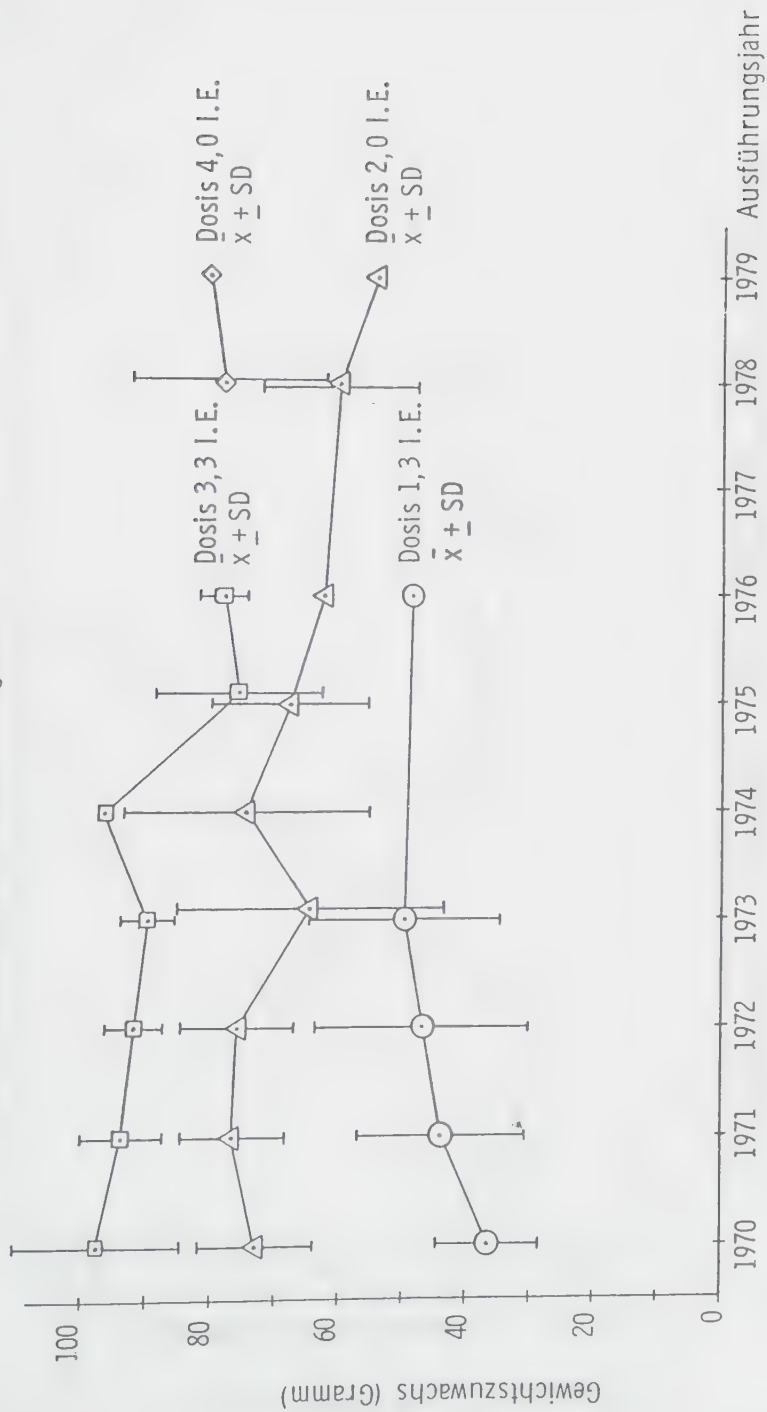


Abb. 6: Vitamin A-Wachstumstest (Ratten)

Gewichtszuwachs als Funktion der Vitamin A-Dosis bei Vitamin A-depletierten Ratten

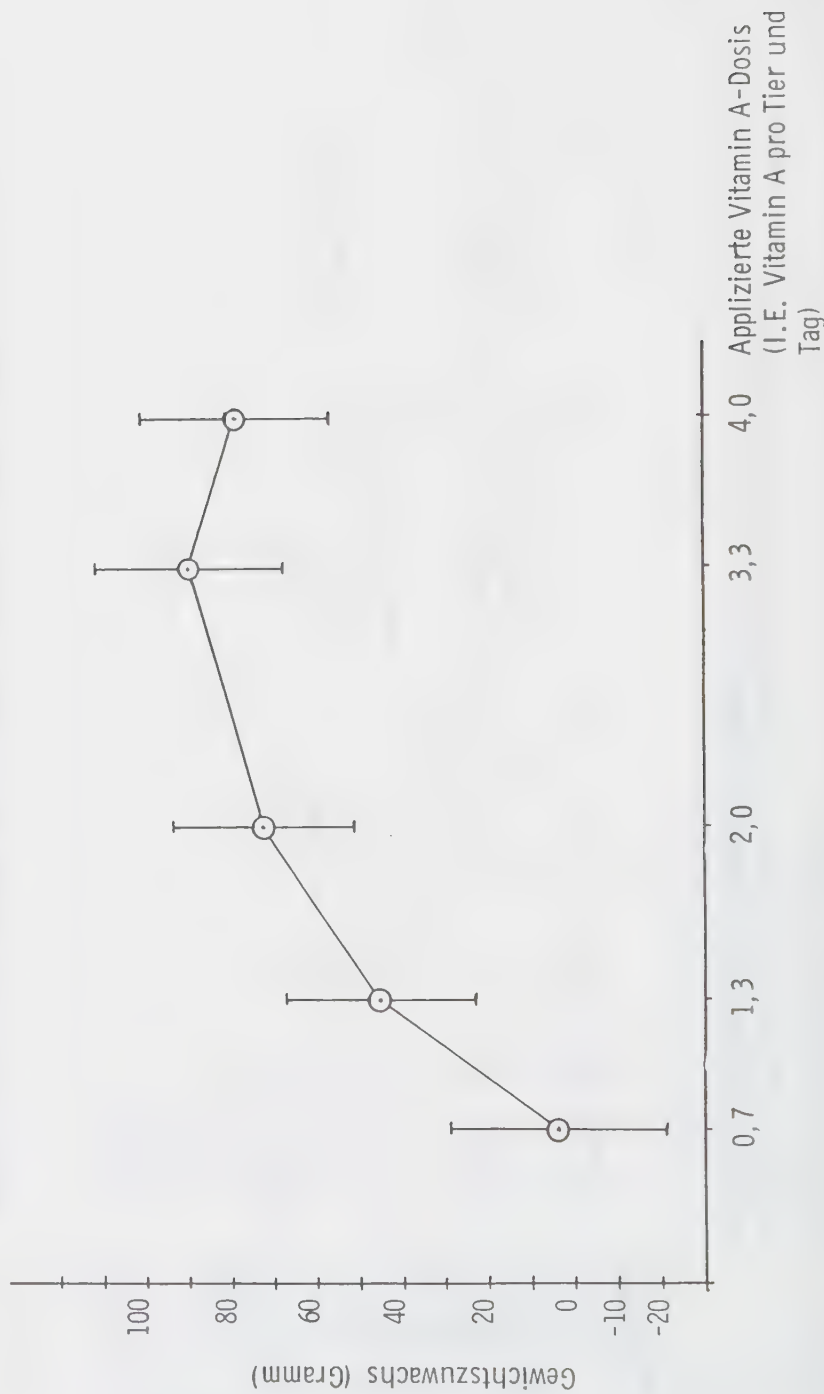


Abb. 7: Vitamin A-Wachstumstest (Ratten)

Wirksamkeit des Testpräparates im Vergleich zum Vitamin A-Acetat-Standard

